UNIVERSITÀ DI PISA
ISTITUTO DI PATOLOGIA VEGETALE
E DI MICROBIOLOGIA AGRARIA E TECNICA
OSSERVATORIO REGIONALE DI FITOPATOLOGIA

209

IMPERIAL MICROBIOLOGICAL INSTITUTE
4 MAR 1941

O. VERONA - G. FLORENZANO

Carica microbica e indice colimetrico nel burro

Estratto dagli ANNALI DELLA FACOLTÀ DI AGRARIA
NUOVA SERIE - VOLUME VI - (XLIV DALLA FONDAZIONE)
— 1945 —

ARTI GRAFICHE TORNAR - PISA

UNIVERSITÀ DI PISA
ISTITUTO DI PATOLOGIA VEGETALE
E DI MICROBIOLOGIA AGRARIA E TECNICA
OSSERVATORIO REGIONALE DI FITOPATOLOGIA

209

O. VERONA - G. FLORENZANO

Carica microbica e indice colimetrico nel burro

Estratto dagli ANNALI DELLA FACOLTÀ DI AGRARIA
NUOVA SERIE - VOLUME VI - (XLIV DALLA FONDAZIONE)
— 1945 —

ARTI GRAFICHE TORNAR - PISA

RIASSUNTO - Gli AA. hanno eseguito, poco dopo il periodo di emergenza, analisi microbiologiche su burro di fabbricazione rustica e di fabbricazione industriale.
Nel primo è stato rinvenuto un numero di microrganismi relativamente elevato; altresì è stata repertata, rispetto al burro di fabbricazione industriale, una maggiore eterogeneità di forme, indice, per queste, la presenza di germi proteolitici, di lieviti, e, in calcuni casi, di microbi riferibili al gruppo di *Bact. coli.*

Dopo un periodo di forzata limitazione, durante il quale il burro costituiva, almeno da noi, prezioso quanto raro alimento, finalmente esso ritornò ai nostri mercati: prima in modo timido e quasi clandestino, vigendo almeno ufficialmente norme di razionamento sui grassi, quindi apertamente ed abbondantemente. Durante il primo periodo trattavasi di burro preparato localmente e di confezione rustica, cioè in pani informi di varia se pur limitata grossezza; quindi, con la ripresa industriale e il ripristinarsi dei mezzi di trasporto, il prodotto ritornò confezionato in pani rettangolari o in cilindri da 100 gr., come di norma etichettato, avvolto in carta pergamenata e piombato.

Ebbene, sulla consistenza microbica del burro non mancano, nemmeno da noi, indagini. Ci si richiama, in modo particolare, a quelle di DALLA TORRE ([1]), di RICCARDO ([2]), di RENCO ([3]). Ulteriori indagini potrebbero sembrare quindi superflue, almeno dal punto di vista delle generali conoscenze al riguardo, amenochè alle ricerche stesse non si voglia attribuire valore di controllo igienico. È, infatti, sotto questo punto di vista che abbiamo istituito le ricerche di cui quì si riferisce, avuto sopratutto riferimento al burro di preparazione rustica. Poichè è notorio come non sia infrequente, nel burro, rinvenire più o meno

(1) - G. DALLA TORRE - *Annali dell'Istituto Sperimentale di Caseificio di Lodi* 1920-21.
(2) - S. RICCARDO - *Annali di Tecnica Agraria.* vol. VI, p. 575, 1933.
(3) - P. RENCO - *Microbiologia del latte e dei latticini* - p. 462, Hoepli, Milano 1939.

numerose specie riferibili al gruppo *coli-aërogenes;* DALLA TORRE in un campione ne ha contate sino a 12.000 per grammo!

* * *

Sarebbe stato desiderabile effettuare, nei campioni oggetto di ricerca, anche l'esame chimico limitatamente, almeno, all'acqua e al grasso, anche perchè si aveva ragione di presumere, in alcuni campioni, un quantitativo in acqua superiore al tollerato. Malauguramente non si fu in condizioni, allora, di effettuare tali prove. Dal punto di vista microbiologico le ricerche furono dirette a stabilire per grammo:

1) il numero, cosidetto, totale di microrganismi (riferibili prevalentemente a fermenti lattici);

2) il numero dei germi proteolitici;

3) il numero dei lieviti;

4) la presenza e il numero di *B. coli.*

In mancanza di norme analitiche ufficiali (1) i metodi seguiti si sono avvicinati in parte a quelli consigliati dal Comitato Americano per i metodi delle analisi microbiologiche (2).

Vale la pena di ricordarli.

PRELEVAMENTO DEI CAMPIONI E ALLESTIMENTO DEL MATERIALE DI SEMINA.

Si preleva almeno in due parti e con ferri sterili una massa di burro di peso non inferiore ai 25 gr. (gli Americani consigliano 1 oncia pari cioè a gr. 30). Il peso si determina, più rapidamente possibile, su capsula previamente tarata e sterile. La massa così pesata si scalda a b. m. a 40-45° C. fino a che non assume un aspetto uniformemente fluido e cremoso: in ogni caso per non oltre 15′. Successivamente, con pipetta calda e sterile, se ne preleva una determinata quantità (1 cc. o più) e si versa immediatamente nell'acqua di diluizione (naturalmente sterile) riscaldata a 40-45° C. - Versato il contenuto

(1) - Si segnala e si deplora questa lacuna. Mentre per le ricerche di ordine chimico esistono dei metodi ufficiali di analisi, nulla di simile esiste per le ricerche microbiologiche. Eppure i tempi potrebbero ben ritenersi maturi per codificare alfine quei procedimenti, tra i tanti suggeriti o seguiti, che più si prestano per speditezza ed esattezza. Addivenendo alla prescrizione di determinati metodi si avrebbe se non altro il vantaggio di rendere i risultati dei diversi sperimentatori tra loro comparabili

(2) - v. *Journ. of Dairy Science,* 1933.

della pipetta nell'acqua la pipetta si sciacqua ripetutamente con la stessa acqua sì che, nella medesima, non rimangano tracce di burro. Il primo recipiente di diluizione, mantenuto caldo, si agita energicamente e a lungo; se ne preleva quindi una determinata aliquota che si versa in altro recipiente pure contenente uno stabilito volume di acqua sterile e tepida. Così, di seguito, fino a raggiungere il numero di diluizioni desiderato, numero che è in relazione alla presunta ricchezza microbica del prodotto e comunque da spingersi, secondo DEMETER [1] fino al milione.

I recipienti di diluizione possono essere variamente foggiati. Nelle nostre ricerche ci siamo serviti di ERLENMEYER da 150 cc. contenenti esattamente 99 cc. di acqua. Acqua e recipienti furono sterilizzati in autoclave.

RICERCA DEL NUMERO TOTALE DEI MICRORGANISMI.

Gli Americani, ove si proceda con il metodo colturale, consigliano per questa ricerca di fare uso di agar-brodo; DEMETER e MAIER di agar-caseina preparato secondo il noto procedimento di FRAZIER e RUPP; RICCARDO impiegò agar siero-peptone e l'agar-Liebig-peptone lattosato. Evidentemente nessuno di questi substrati ci informa realmente sul contenuto *totale* dei microrganismi presenti nel burro. D'altra parte, siccome il numero maggiore dei germi è rappresentato dai fermenti lattici, abbiamo pensato di adoperare l'agar peptolattosato di DEMETER modificato da uno di noi [2]. Esso dà, effettivamente, rispetto agli altri substrati, risultati migliori.

RICERCA DEL NUMERO DEI PROTEOLITICI.

È stato seguito uno dei metodi proposti dal Comitato americano. Con il metodo delle diluizioni si è cioè inoculato latte magro presente lo 0.005 % di bromo-cresol-porpora. Tenute le provette, per 5 giorni, a 21° C. la presenza di proteolitici imprime al latte una colorazione grigia.

RICERCA DEL NUMERO DEI LIEVITI.

Fu impiegato agar-malto.

(1) - DEMETER e MAIER - *Mitchw. Forsch.*, vol. II, 1931.
(2) - O. VERONA - *Riv. It. d'Igiene*, 1946.

DETERMINAZIONE DEL COLI-TITOLO.

Sono stati seguiti i procedimenti già adottati da RICCARDO il quale fece uso del terreno di NERI [1] e del terreno di SAVAGE: questo, con o senza glucosio.

Il terreno di NERI è costituito da brodo Liebig-peptone lattosato (estratto di carne Liebig 1 %, peptone Witte 1 %, cloruro di sodio 0,5 %, lattosio 1,5 %) al quale viene aggiunto lo 0,5 % di una soluzione all' 1 % di rosso fenolo in carbonato sodico $\frac{N}{10}$. In questo terreno, distribuito in tubi in ragione di cc. 15 vengono aggiunte diluizioni progressive — da cc. 1 a cc. 0,00001 — del materiale in esame. Incubato a 37° C. si ha indizio della presenza del coli-bacillo allorquando il rosso-fenolo vira al giallo. Il metodo richiede tuttavia ulteriore accertamento poichè il viraggio del rosso-fenolo può avvenire anche per opera degli streptococchi lattici.

Il terreno di SAVAGE è costituito, come è noto, da estratto Liebig 1 %, peptone Witte 1 %, cloruro di sodio 0,5 %, glucosio 1 %, rosso neutro 0,005 %. In questo terreno *Bact. coli* produce gas e vira in 24 ore il colore rosso del liquido in giallo con fluorescenza verdastra. Questa risulta più evidente quando il brodo di SAVAGE non contenga zucchero. In ogni caso l'accertamento diagnostico segue attraverso l'esame delle colture di isolamento che furono effettuate su piastre allestite con agar DRIGALSKI-CONRADI.

* * *

Nella Tabella allegata figurano i risultati ottenuti. Occorre precisare che alcuni campioni di burro non confezionato in pani stampati furono prelevati in quel di Firenze (Fi), altri in quel di Pisa (Pi). Dei primi se ne ignora l'origine. I secondi, con tutta probabilità, sono affluiti a Pisa dalle zone limitrofe al confine della Lucchesia.

Ebbene, gli stessi risultati indicano nei burri di fabbricazione rustica, come era facilmente prevedibile, un numero di microrganismi relativamente elevato, con un minimo di 9.670.000 per grammo ed un massimo di 66.290.000.

(1) - F. NERI e F. SIMONETTI - *Ann. d'Igiene*, v. 40, 1930.

Assai inferiore apparì, per contro, il numero dei germi nel prodotto, confezionato in pani, di fabbricazione industriale pur presentandosi in alcuni campioni maggiore di quanto si aveva ragione di sospettare.

Gli stessi risultati dimostrano inoltre, nel burro di campagna, una maggiore eterogeneità di forme — indice la presenza di germi proteolitici e di lieviti — e la presenza, in alcuni casi, di microbi riferibili al gruppo di *Bact. coli.*

Quest'ultima constatazione, unita a quella di precedenti ricercatori, dà ancora una volta ragione alla Legge per la quale si prescrive (R. D. 6 aprile 1933, n. 381 - «*Disciplina della produzione e vendita dei formaggi pecorino e vacchino, del burro e dei suoi succedanei*») quanto segue:

«Il burro ed i suoi succedanei posti in vendita per il consumo diretto debbono essere confezionati in pacchi sigillati, aventi il peso netto non superiore ad un chilogrammo. Il sigillo deve essere congegnato in modo che, in seguito alla apertura del pacco, venga reso ulteriormente inservibile».

«Sull'involucro che racchiude il solido di burro o suoi succedanei debbono risultare, in caratteri indelebili e ben visibili, mediante timbratura, la denominazione del prodotto, il peso del solido, il nome e cognome o la ragione sociale e il luogo di residenza del produttore»....

Con tali norme, infatti, ove si procedesse a determinazioni, oltrechè chimiche, anche microbiologiche verrebbero resi possibili più efficaci controlli igienici.

	N° di microrganismi presenti in gr. 1 di burro						
	fermenti-lattici in agar DEMETER - - VERONA 1	*proteolitici* in latte al bromo-cresol porpora 2	*lieviti* in agar-malto 3	gruppo *-coli* secondo il metodo di NERI 4	gruppo *-coli* in brodo SAVAGE glucosato 5	gruppo *-coli* in brodo SAVAGE non glucosato 6	Totale (1+2+3+4) 7
1 - Burro di fabbricazione rustica (Fi)	65.440.000	200.000	640.000	10.000	7.500	7.000	66.290.000
2 - id. (Fi)	27.060.000	50.000	315.000	5.000	5.000	?	27.430.000
3 - id (Pi)	44.720.000	75.000	473.000	7.500	5.000	?	45.275.500
4 - id. (Pi)	9.530.000	10.000	130.000	—	—	—	9.670.000
5 - Burro di fabbricazione industriale	8.040.000	5.000	26.000	—	—	—	8.071.000
6 - id	26.330.000	10.000	115.500	500	—	—	26.456.000
7 - id.	18.515.000	25.000	40.000	—	—	—	18.580.000
8 - id.	6.320.000	—	5.000	—	—	—	6.325.000
9 - id.	9.175.000	5.000	30.000	100	—	—	9.210.100
10 - id.	31.450.000	20.000	7.000	—	—	—	31.477.000